

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Instituto de Biologia

Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura



Trabalho de Conclusão de Curso

**Investigação de Elementos de Transposição em *Drosophila suzukii*
(MATSUMURA, 1931) (Diptera, Drosophilidae) e *Drosophila malerkotliana*
PARSHAD & PAIKA, 1964 (Diptera, Drosophilidae)**

Lucas Reinaldo Wachholz Romano

Pelotas, 2018

Lucas Reinaldo Wachholz Romano

**Investigação de Elementos de Transposição em *Drosophila suzukii*
(MATSUMURA, 1931) (Diptera, Drosophilidae) e *Drosophila malerkotliana*
PARSHAD & PAIKA, 1964 (Diptera, Drosophilidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Monica Laner Blauth

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R759i Romano, Lucas Reinaldo Wachholz

Investigação de elementos de transposição em *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera, Drosophilidae) e *Drosophila malerkotliana* Parshad & Paika, 1964 (Diptera, Drosophilidae) / Lucas Reinaldo Wachholz Romano ; Monica Laner Blauth, orientadora. — Pelotas, 2018.

37 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Transposons. 2. Espécie invasora. 3. Transferência horizontal. 4. Galileo. 5. Hobo. I. Blauth, Monica Laner, orient. II. Título.

CDD : 595.771

Lucas Reinaldo Wachholz Romano

Investigação de Elementos de Transposição em *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931) (Diptera, Drosophilidae) e *Drosophila malerkotliana* PARSHAD & PAIKA, 1964 (Diptera, Drosophilidae)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Monica Laner Blauth (Orientadora)
Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fábio Ricardo Pablos de Souza
Doutor em Genética pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marco Antonio Tonus Marinho
Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas

Resumo

ROMANO, Lucas Reinaldo Wachholz. **Investigação de Elementos de Transposição em *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931) (Diptera, Drosophilidae) e *Drosophila malerkotliana* PARSHAD & PAIKA, 1964 (Diptera, Drosophilidae)**. 2018. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura) – Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença de elementos de transposição em *Drosophila suzukii* e *Drosophila malerkotliana*, uma vez que estas são duas espécies de caráter invasor e que estão se disseminando rapidamente pelo mundo. Uma possível explicação para essa rápida expansão seria a mobilização de elementos de transposição (TEs) no genoma dessas espécies, considerando que a evolução destes genótipos pode levar a fenótipos adaptativos. Até o presente momento, não houve registro de nenhum tipo de TE para *D. suzukii*, embora tenha sido comprovada certa semelhança entre o seu genoma e o de *D. melanogaster*. Contrariamente, para *D. malerkotliana*, foram encontrados no genoma os elementos *gypsy*, 297, *copia* e 412, porém com sinais de hibridação fracos, sugerindo que os mesmos tenham baixa identidade de sequência com os de *D. melanogaster*. Neste estudo, foram realizados diversos procedimentos que incluíram o estabelecimento de isolinhagens das espécies, extração de DNA total, PCR e eletroforese, para possibilitar a identificação de um possível TE, técnica de clonagem para posterior sequenciamento e análise computacional das sequências obtidas. A análise BLAST mostrou a existência de uma sequência com 649 pb no genoma de *D. suzukii* com 100% de identidade ao elemento *hobo*. Os resultados obtidos foram positivos para as PCRs com os oligonucleotídeos iniciadores *GalR-F* e *Gal1-2*, desenhados para o elemento *Galileo*, revelando a presença deste elemento no genoma de *D. suzukii* e *D. malerkotliana*. Obteve-se a sequência de um dos fragmentos encontrados em *D. suzukii* com identidade ao TE *Galileo*. Também foi detectado um sinal fraco do elemento 412 em *D. suzukii*, indicando que o mesmo possa ter acumulado um número elevado de mutações. O presente estudo, além de elencar TEs para investigação nas espécies em questão, contribui com a informação da distribuição destes elementos no grupo *melanogaster* e com o entendimento da transferência horizontal e das perdas estocásticas de TEs ao longo da evolução das espécies.

Palavras-chave: transposons; espécie invasora; transferência horizontal; *Galileo*; *hobo*

Asbtract

ROMANO, Lucas Reinaldo Wachholz. **Research on Transposing Elements in *Drosophila suzukii* (MATSUMURA, 1931) (Diptera, Drosophilidae) and *Drosophila malerkotliana* PARSHAD & PAIKA, 1964 (Diptera, Drosophilidae).** 2018. 37f. Graduation in Biological Sciences - Licenciatura - Biological Sciences - Licenciatura, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

The present study was aimed to investigate the presence of transposable elements (TEs) in *Drosophila suzukii* and *Drosophila malerkotliana*, two invasive species that are spreading rapidly throughout the world. A possible explanation for this rapid expansion would be the mobilization of TEs in the genome of these species, considering that the evolution of these genotypes can lead to adaptive phenotypes. To date, there are no records for any type of TEs for *D. suzukii*, although a certain similarity has been established between its genome and that of *D. melanogaster*. In contrast, for *D. malerkotliana*, the *gypsy*, 297, *copy* and 412 elements were found in the genome of this species, but with weak hybridization signals, suggesting that both have low identity with *D. melanogaster*. In this study, several procedures were performed, including the establishment of isolineages, DNA extraction, PCR and electrophoresis, to enable the identification of a possible TE, cloning technique for sequencing and computational analysis of the obtained sequences. BLAST analysis showed the existence of a sequence with 649 bp in the *D. suzukii* genome with 100% identity to the *hobo* element. Results were positive for the *GalR-F* and *Gal1-2* primers designed for the *Galileo* element, revealing the presence of this element in the genome of *D. suzukii* and *D. malerkotliana*. The sequence of one of the fragments found in *D. suzukii* with the identity to the TE *Galileo* was obtained. A weak signal from element 412 was also detected in *D. suzukii*, possibly indicating that it has accumulated a high number of mutations. The present study, in addition to listing elements for research in the species in question, contributes to the information TEs distribution in the *melanogaster* group and to the understanding of the horizontal transference and the stochastic losses of the elements along the evolution of the species.

Key-words: transposons; invasive species; horizontal transfer; *Galileo*; *hobo*

Lista de Figuras

- Figura 1 Gráfico com a porcentagem referente ao número de sequências, com identidade ao TE *hobo*, encontradas em *D. kikkawai*, *D. suzukii*, *D. yakuba*, *D. simulans* e *D. sechellia*..... 23
- Figura 2 Cladograma de similaridade entre as sequências do TE *hobo* de espécies do grupo *melanogaster* com identidade à sequência encontrada em *D. suzukii*. Os números indicam divergência entre as sequências em relação à sequência de *D. suzukii*..... 23
- Figura 3 Gel de agarose, corado em Gel Red, com os produtos de PCR usando os pares de iniciadores *GalR-F* e *Gal1-2* do TE *Galileo*. Dm: *D. malerkotliana*; Ds: *D. suzukii*; +: controle positivo *D. melanogaster*, e marcador de peso molecular 1Kb DNA *ladder*, identificado à direita..... 24
- Figura 4 Cladograma de similaridade com base na sequência de *Galileo* encontrada no genoma de *D. suzukii*. Valores significam o grau de similaridade das sequências encontradas com a sequência canônica do elemento..... 25
- Figura 5 Árvore de máxima verossimilhança com melhor pontuação de 15 espécies de *Drosophila* + grupo externo de *A. gambiae* (não mostrado) usando 5.322 partições gênicas com 5.199.249 locais. O modelo é JTTF + Γ 27

Lista de Tabelas

Tabela 1	Descrição dos iniciadores utilizados nas PCRs para investigação de TEs em <i>D. sukukii</i> e <i>D. malerkotliana</i>	19
Tabela 2	Resultado de maior escore em BLASTN de sequências de TEs no genoma de <i>D. sukukii</i> . Sequências dos TEs <i>P</i> , <i>hobo</i> , <i>gypsy</i> e <i>412</i> usadas na análise são sequências completas, enquanto que as de <i>Galileo</i> , <i>BuT2</i> e <i>Mar</i> são referentes a diferentes clones.....	22

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Revisão da Literatura.....	13
2.1 Elementos de Transposição – TEs.....	13
2.2 Transferência Horizontal – TH.....	15
2.3 TEs descritos para <i>D. malerkotliana</i>	16
2.4 TEs descritos para <i>D. sukuzii</i>	16
3 Metodologia.....	17
3.1 Análises.....	17
3.2 Manutenção das espécies.....	18
3.3 Extração de DNA.....	18
3.4 Reação de Polimerização em Cadeia – PCR.....	18
3.5 Eletroforese.....	20
3.6 Clonagem, Transformação Bacteriana e Extração de DNA Plasmidial..	21
3.7 Sequenciamento.....	22
4 Resultados.....	22
4.1 Análise BLASTN de sequências dos TEs.....	22
4.2 Reações de PCR.....	25
4.3 Análise da sequência de <i>Galileo</i> de <i>D. sukuzii</i>	26
5 Discussão.....	26
6 Considerações finais.....	29
Referências.....	30
Apêndices.....	37

1 Introdução

Espécies invasoras possuem capacidade de sobreviver, reproduzir e dispersar em ambientes não nativos, sendo importantes não apenas pelos danos ecológicos que podem promover, mas também pelos mecanismos adaptativos relacionados a sobrevivência destas espécies a novos ambientes, os quais são também de interesse evolutivo (HUEY; GILCHRIST; HENDRY, 2005).

Dentre as espécies invasoras do gênero *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae), abordaremos duas do subgênero *Sophophora*: *D. malerkotliana* PARSHAD; PAIKA, 1964 e *D. suzukii* (MATSUMURA, 1931). *Drosophila malerkotliana* é originária da Ásia e vem ampliando sua distribuição em diferentes continentes nas últimas décadas (BIRDSLEY, 2003). Seu primeiro registro no Brasil foi em 1976 (VAL; SENE, 1980). *Drosophila suzukii* é originária da Ásia oriental e encontra-se em expansão mundial na atualidade, tendo se alastrado rapidamente por países da Europa e América do Norte (GOODHUE et al, 2011). Seu primeiro registro na América do Sul foi na região sul do Brasil, em 2013 (DEPRÁ et al, 2014).

Para estas duas espécies tropicais não existem estudos, até o momento, que tenham investigado seus níveis globais de variação genética. De acordo com Birdsley (2003) e Garcia et al (2005), *D. malerkotliana* ampliou seu alcance em regiões tropicais e subtropicais em diferentes continentes, apesar da espécie ter demonstrado menor resistência à dessecação e ao estresse térmico. Os mesmos autores relataram ainda o alcance desta espécie a climas temperados quentes dos estados do sul da América do Norte, como Flórida e Geórgia, durante os meses de setembro e outubro, estando isto possivelmente relacionado à crescente urbanização e ao aquecimento climático, que talvez tenham proporcionado refúgios mais quentes à espécie nestas regiões.

No caso de *D. suzukii*, a literatura traz o primeiro relato da espécie, fora do seu local de origem, no Havaí, sendo comumente encontrada no país no início da década de 80 (KANESHIRO, 1988). Porém, foi a partir de seu registro nos Estados Unidos, em 2008, que a espécie ganhou *status* de praga invasora em expansão global (CALABRIA et al, 2012; CINI et al, 2012; HAUSER, 2011; LEE et al, 2011). Na

Europa, foi detectada pela primeira vez no Mediterrâneo (Espanha, França e Itália) em 2009, sendo que até 2012 já havia sido notificada em 11 outros países, incluindo a Rússia (CINI et al, 2012; ROTA-STABELLI et al, 2013). Mais recentemente, Deprá et al (2014) registrou este novo invasor em áreas de Mata Atlântica subtropical nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na região sul do Brasil. No entanto, segundo Calábria et al (2012), *D. suzukii* já tinha sido anteriormente coletada na Região Neotropical, na Costa Rica, em 1997, e no Equador, em 1998. Em 2014, a espécie também foi registrada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Distrito Federal, Brasil, que são distantes cerca de 1700 km de seu primeiro registro no país (BITNER-MATHÉ, 2014; DEPRÁ et al, 2014; PAULA, 2014 apud DOS SANTOS, 2017).

Além de serem duas espécies que apresentam capacidade invasiva, *D. suzukii*, em particular, se caracteriza por ser praga da fruticultura, pois consegue perfurar frutos de pele fina, sobretudo os de interesse econômico como morangos, mirtilos, amoras e framboesas. Este comportamento é facilitado pela presença de um ovipositor serrilhado (CHIU et al, 2013). Entretanto, de acordo com Coates (2009), ela infesta grande diversidade de frutos.

Vale ressaltar que os primeiros registros desta espécie nas regiões invadidas foram relatados próximos à costa, perto aos portos marítimos, sugerindo que os primeiros indivíduos chegaram como ovos ou larvas em frutos importados da Ásia (ROTA-STABELLI et al, 2013). É provável que o comércio internacional de frutos também esteja relacionado com a invasão de *D. suzukii* no Brasil, possibilitando a espécie ter colonizado novas áreas a partir de frutas importadas da Ásia ou mesmo de outras regiões onde já estavam estabelecidas populações da mesma (DEPRÁ et al, 2014).

Uma possível explicação para a capacidade dispersiva de espécies invasoras pode estar relacionada com sequências de DNA chamadas Elementos de Transposição (TEs). Essas sequências têm habilidade de, por diferentes mecanismos, alterar sua posição no genoma e se replicarem dentro dele. Quando mobilizadas, estas sequências podem causar, de forma simplificada, alterações em regiões codificantes, bem como, alterações na expressão dos mesmos, que, como qualquer mutação, podem ter um efeito deletério, neutro ou

adaptativo (CONTE et al, 2002; MARSANO et al, 2005). Ao mesmo tempo, os TEs podem ser agentes de diversidade genética de maneira indireta, quando cópias de um mesmo elemento em diferentes *loci* atuam como sítios para recombinação homóloga, promovendo grandes reorganizações genômicas (CARARETO et al, 2015).

Dois exemplos de fenótipo adaptativo são o aumento da termotolerância, relatado a inserção do elemento *P* na região promotora do gene que codifica *Hsp70* e resistência a inseticidas, relacionado ao aumento da expressão do gene *citocromo P450* correlacionada à inserção de *LTR* do elemento *Accord* na região promotora, ambos descritos em populações naturais de *D. melanogaster* (FESCHOTTE, 2008). Para esta mesma espécie, Gonzáles (2009) sugeriu que a alta taxa de transposição induziu adaptações importantes para o seu comportamento cosmopolita.

OBJETIVOS

Tendo em vista a importância dos TEs para a evolução rápida do genoma, levando a potenciais fenótipos adaptativos, e o caráter invasor de *D. malerkotliana* e *D. sukuzii*, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de elementos de transposição nestas duas espécies.

Os objetivos específicos são:

- Verificar sequências com identidade aos TEs: elemento *P*, *hobo*, *412*, *gypsy*, *Mar*, *BuT* e *Galileo*;

- Verificar se as sequências presentes nos genomas são vestigiais ou potencialmente funcionais.

2 Revisão da Literatura

2.1 Elementos de Transposição – TEs

Sequências repetitivas são responsáveis por cerca de 50% dos genomas de mamíferos e insetos, com algumas estimativas sugerindo que aproximadamente 70% dos genomas humanos são derivados por este tipo de sequência (KONING et al, 2011). Grande parte dessas sequências são TEs que, de acordo com Chenais et al (2012), podem ser entendidos como sendo sequências de DNA capazes de se mover e invadir genomas.

Os TEs podem trazer efeitos positivos, negativos, bem como neutros para o organismo hospedeiro. Estruturalmente, são constituídos por segmentos de DNA localizados em regiões não codificadoras de proteínas, no entanto podem ser encontrados também em regiões codificadoras. Particularmente preocupantes são os seus efeitos deletérios, resultado de inserções e deleções do elemento dentro de sequências codificadoras e regulatórias que podem comprometer a expressão de um gene. Além disso, estão envolvidos também na promoção de eventos de recombinação desigual (FAULKNER, 2011; KAER, 2013).

Porém, se anteriormente foram considerados "DNA lixo", estudos recentes evidenciam cada vez mais que os TEs podem realizar um conjunto de importantes funções estruturais no genoma, como a manutenção dos centrômeros e da integridade dos telômeros. TEs também podem apresentar funções relacionadas a regulação da expressão gênica, funcionando como promotores alternativos ou reguladores de expressão através do silenciamento por interferência; podem criar locais de *splicing* de introns e sinais de poliadenilação; além de servirem como estruturas de recombinação gênica para uma rápida remodelação do genoma, podendo causar um impacto na regulação da transcrição de genes adjacentes. Assim sendo, TEs podem ser considerados como fonte de nova informação genética e como precursores evolutivos de genes em diferentes genomas (BELAN, 2013; CARARETO et al, 2015; JURKA, 2007; OSTERTAG, 2001).

Segundo Craig et al (2002), a mobilidade dos TEs está associada a diversas estratégias de replicação. De acordo com a sua estrutura molecular e ciclo de vida, os TEs são classificados em retrotransposons (classe I) e transposons de DNA (classe II), refletindo a presença ou a ausência de um RNA intermediário no processo de transposição, respectivamente (CRAIG et al, 2002; WICKER et al, 2007). Os TEs de classe I se propagam usando um mecanismo de copiar-e-colar, por meio de um RNA intermediário (GOODIER; KAZAZIAN, 2008), sendo acumulado no genoma em números significativamente maiores que os elementos de classe II. Os TEs de classe II, por sua vez, podem mudar sua posição dentro do genoma utilizando um mecanismo de cortar-e-colar, contendo em suas extremidades porções terminais invertidas (ITRs), sendo este um mecanismo conservativo (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007; LANDER et al, 2001).

Segundo Miousse et al (2015), a expressão de TEs pode ser autorregulada (TE-mediada) ou regulada por mecanismos mediados pelo hospedeiro. No controle TE-mediado, o elemento apresenta todos os genes necessários para sua transposição, sem que isso implique que o mesmo seja funcional, enquanto que os mecanismos mediados pelo hospedeiro para o controle sobre os TEs estão principalmente associados a fatores epigenéticos que incluem metilação do DNA, modificações de histonas e regulação por pequenos RNAs (sRNAs) (REBOLLO, 2012; SCHLÄPPI, 1994).

A filogenia dos TEs, conhecida até então, leva a proposição de dois mecanismos de transmissão (MONTCHAMP-MOREAU et al, 1993). O primeiro é a transferência vertical, que ocorre de uma espécie ancestral para a sua descendente, que se separam por processos de especiação. O segundo é a transferência horizontal, sugerida pela incongruência entre a filogenia das espécies hospedeiras e a filogenia dos TEs, e que ocorre entre espécies isoladas reprodutivamente através de um fator exógeno (DANIELS et al, 1990; HOUCK et al, 1991; LORETO et al, 2008).

2.2 Transferência Horizontal - TH

A possibilidade de perda estocástica de TEs sugere que deve haver uma eliminação progressiva dos genomas até a sua extinção, mas isto contrasta com o fato de que eles são encontrados em todas as formas de vida (CRAIG et al, 2002). A TH entre as espécies é o meio mais provável pelo qual TEs podem escapar da extinção (HARTL et al, 1997; SANCHEZ-GRACIA et al, 2005).

De acordo com Rankin et al (2011), a TH de genes, ou transferência lateral de genes, pode ser entendida como a passagem de material genético entre espécies que não seja a transferência vertical, ou seja, pelo processo de descendência.

Evidências sugerindo ocorrência de TH entre duas espécies consistem na observação de fragmentos de DNA compartilhados entre duas linhagens que apresentam certo nível de divergência de nucleotídeos nos seus sítios, divergência esta que, de forma neutra, é muito menor do que a divergência neutra média entre genomas transmitidos verticalmente nas duas espécies, uma vez que as sequências de TEs estão sujeitas a forças evolutivas semelhantes às que operam sobre os genomas dos hospedeiros (CAPY, 1994; HARTL et al, 1997; LORETO et al, 2008).

As evidências de TH e a troca de material genético entre espécies reprodutivamente isoladas tem se acumulado ao longo das últimas décadas, inclusive para organismos eucariotos multicelulares (ORTIZ et al, 2015).

No caso da TH, certamente há relação ecológica entre as espécies hospedeiras e muitas dúvidas referentes à filogenia dos TEs devem-se ao pouco conhecimento da distribuição e das relações ecológicas entre essas espécies, assim como o pouco conhecimento sobre os polimorfismos ancestrais presentes nas sequências de TEs (KIDWELL, 1992; LOHE et al, 1995).

Os mecanismos e as relações ecológicas que promovem esse fenômeno ainda são pouco conhecidos, mas a interação hospedeiro-parasita é um tipo de relacionamento normalmente apontado na literatura que poderia potencializar a TH entre as espécies, porque as espécies envolvidas em tais relações estão geralmente em contato próximo (ORTIZ et al, 2015).

2.3 TEs descritos para *D. malerkotliana*

Em um estudo feito por De Setta e Carareto (2007), foram pesquisados um total de dez TEs em uma população brasileira de *D. malerkotliana* amostrada no município de Onda Verde – SP, sendo eles os elementos *copia*, *mdg-1*, *412*, *gypsy*, *297*, *micropia*, *roo/B104*, *jockey* e *doc* (elementos de classe I) e *bari-1* (elemento de classe II). Os resultados revelaram a presença de todos os elementos estudados no genoma de *D. malerkotliana*. No entanto, com exceção dos elementos *doc*, *micropia* e *bari-1*, que apresentaram sinais de hibridação notavelmente fortes para essa espécie, todos os demais produziram sinais de hibridização fracos, o que sugere que esses TEs são divergentes dos de *D. melanogaster* e que eles devem ter evoluído verticalmente, acumulando variação de nucleotídeos desde o último ancestral comum.

Os resultados encontrados por De Setta e Carareto (2007) quanto a presença dos elementos *copia* e *412* nesta espécie corroboraram estudos anteriores (CIZERON et al, 1998), mas a ocorrência de *297*, *roo/B104*, *mdg-1*, *gypsy* e *micropia*, *doc* e *jockey* e *Bari-1* corresponde ao primeiro relato desses TEs em *D. malerkotliana*.

2.4 TEs descritos para *D. suzukii*

De acordo com Chui et al (2013) o genoma de *D. suzukii* contém 13.583 genes codificadores de proteínas, dos quais 12.984 (96,4%) têm semelhança com outras 14 espécies de *Drosophila*, incluindo 12.389 de *D. melanogaster* (91,2%) (SpottedWingFlyBase: <http://spottedwingflybase.oregonstate.edu>).

O mesmo autor relata que os TEs presentes no genoma de *D. suzukii* podem apresentar uma semelhança de 50% com os TEs descritos para *D. melanogaster*. Embora esta seja uma proporção alta, é difícil comparar diretamente estes resultados, pois os TEs podem variar em comprimento, sendo as sequências curtas

mais difíceis de serem identificadas devido a semelhanças entre os diversos tipos de elementos diferentes (CHUI et al, 2013).

3 Metodologia

A metodologia para este trabalho foi dividida em seis passos, conforme descritos a seguir.

3.1 Análises

Foi feita uma busca *online* para aferir sobre a presença dos TEs através da ferramenta BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) no genoma de *D. suzukii*, disponível em <<http://spottedwingflybase.org/blastN>>. Para a busca, foram utilizadas as sequências canônicas dos TEs *P*, *hobo*, *412*, *gypsy*, clones de *Galileo*, *BuT* e *Mar*. Para o TE *hobo*, foi realizado BLAST para encontrar sequências com identidade a ele nos genomas de 22 espécies pertencentes a família Drosophilidae, incluindo *D. suzukii*, *D. erecta*, *D. ficusphila*, *D. eugracilis*, *D. biarmipes*, *D. takahashii*, *D. elegans*, *D. rhopaloa*, *D. ananassae*, *D. bipectinata*, *D. pseudoobscura pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. miranda*, *D. willistoni*, *D. mojavensi*, *D. virilis*, *D. albomicans*, *D. grimshawi*, *D. yakuba*, *D. simulans*, *D. sechellia* e *D. kikkawai*, a fim de alinharmos as sequências. Ambos os genomas estão disponíveis nos sites: <<http://spottedwingflybase.org/>> e <<http://flybase.org/blast/>>. Para o alinhamento foi utilizado o algoritmo *ClustalW* (LARKIN et al, 2007).

A sequência obtida do elemento *Galileu* foi editada no programa Staden 4.1 (STADEN, 1996) e alinhada com sequências de Drosophilidae disponíveis no banco de dados do NCBI (GenBank) ou sites de projetos genomas usando o algoritmo *ClustalW* (LARKIN et al, 2007).

3.2 Manutenção das espécies

Os exemplares de *D. malerkotliana* foram coletados em Florianópolis, SC, nas seguintes coordenadas: 27° 43' 12"W, 48° 33' 36"S, sendo feita a captura de adultos através de armadilhas com isca de frutas fermentadas. Os indivíduos coletados foram fixados em etanol absoluto.

Os exemplares de *D. suzukii* foram obtidos por emergência em frutos coletados no Horto Botânico Irmão Teodoro Luis, Capão do Leão, RS, sob as coordenadas: 52° 25' 55"W, 31° 48' 58"S. Os frutos coletados foram acondicionados em vidros com uma camada de areia autoclavada e mantidos em estufa, com temperatura entre 20 e 23°C. Assim que houve a emergência dos adultos, foi selecionado um casal de moscas e transferido para um novo vidro contendo meio de cultura padrão do laboratório (uma banana, 0,2% de farinha de milho, 1,0% de ágar, 400 ml de água destilada e 0,2% de nipagin eluído em álcool) e uma uva, possibilitando que haja a oviposição, a fim de se estabelecer uma isolinhagem, aumentando o número de indivíduos da espécie para extração de DNA, sem gerar uma grande variação genética.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA de um indivíduo, ou de mais indivíduos da mesma isolinhagem, foi feita utilizando-se o kit NucleoSpin Tissue (Machery-Nagel), de acordo com protocolo do fabricante.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

As reações de PCR foram feitas em volume final de 15 µl. Foi usado para cada reação de 20 a 50 ng de DNA molde, 20 Und de cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*), 1x tampão de reação, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs e 0,75

U de Taq DNA polimerase (*Taq recombinante*, *Invitrogen* ou *GoTaq*, *Promega*). As condições de amplificação foram como segue: desnaturação inicial a 94°C durante 5', 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45", anelamento de iniciadores a 57°C durante 30" e extensão a 72°C durante 40", seguido pela extensão final a 72°C durante 3'.

Todas as reações foram realizadas analisando amostras de DNA de *D. suzukii*, *D. malerkotliana* e *D. melanogaster*, sendo esta última utilizada como controle positivo de algumas reações, devido ao fato desta espécie ser amplamente estudada, possuindo um grande número de iniciadores desenhados de acordo com os TEs encontrados no seu genoma e por pertencer ao mesmo grupo taxonômico das espécies que foram o foco do estudo. Os iniciadores utilizados para este estudo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos iniciadores utilizados nas PCRs para investigação de TEs em *D. suzukii* e *D. malerkotliana*.

TE	Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Identidade da sequência	Referência
Element	P1 + P2	TGCTTCGCTTGATGGCTT CAACTCATCCATTTCCGGT	<i>D. melanogaster</i>	O'Hare; Rubin, 1983.
	ITR	CATAAGGTGGTCCCCTCG ACCGTCGACATGTGGAC	<i>D. melanogaster</i>	Haring et al, 1995
	P991+P1407	GTAGTTGGAGTTCCATCTAGT	<i>D. melanogaster</i>	Klein, 2002
Hobo	P651+P1597	CACCTCCAATTTATCCCGCC GGATGGCAATACGAAGC	<i>D. melanogaster</i>	Rufo, 1997
	Hva1s+2as	CATAACGGAAGGGTAGAGAAG CGTCCACCCGATAAACTC	<i>D. simulans</i>	Torres, 2005
412	RTS+ RTAS	GCGATTGCCATTTGGCTTT TGGGGTTCACCATCGAGAA	<i>D. melanogaster</i>	Blauth et al, 2011
Gypsy	3S2 + 3AS2	AAAGGCGAYTTGGTTGACACTCC CARGTGGCTRGGTTGRGTGTG	<i>D. melanogaster</i> , <i>D. virilis</i> e <i>D. subobscura</i> ,	Herédia; Loreto; Valente, 2004
Mar	MarF + R	CGCGAATCGTATGTGAA CGATGTGAGCACGAAGTACA	<i>Grupo willistoni</i>	Deprá et al, 2012
	Mar2 F+R	CGGACGAAAGGGTATTA GCCGTTACACTTGTTCCTA	<i>D. tropicalis</i>	Deprá et al, 2012
BuT	BuT2 R+F	CAGTGCTGCCAACAWTTYGT CASTGCTGCCAATTTAGC	<i>D. buzzatii</i> , <i>D. willistoni</i> e <i>D. mojavensis</i>	Rossato et al, 2014
	BuTC R+F	AGACYTCGGGRACAGTTTTGC AGCATTAAATGCYAARCTTTC	<i>D. buzzatii</i> e <i>D. willistoni</i>	Rossato et al, 2014.
Galileo	Gal846+3247	TGTTCTTGCTCCTCTGTTCC CTTATGTATCACGAATCCCG	<i>D. willistoni</i>	Marzo et al, 2008

3.5 Eletroforese

A extração de DNA genômico e os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 0,8% eluído em TAE (Tris 10 mM, ácido acético 0,6% e EDTA 1 mM), para observação quanto a sua integridade e quantidade estimada, e também quanto ao número e tamanho de fragmentos de DNA amplificados. Para a quantificação, o

material genético foi comparado com diferentes quantidades de DNA de bacteriófago Lambda (Invitrogen) e a estimativa de tamanho dos fragmentos foi feita por comparação com 1kB ou 50 pb DNA *ladder* (Ludwig).

3.6 Clonagem, transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

Os produtos de PCR foram clonados em vetor pGEM T-easy Vector (Promega), segundo protocolo do fabricante, para serem posteriormente sequenciados.

A transformação bacteriana foi feita segundo protocolo de choque-térmico (SAMBROOK; RUSSE, 2001). As bactérias transformadas pelo plasmídeo foram selecionadas por meio seletivo contendo ampicilina (50 µg/µL) e a triagem das bactérias transformadas por plasmídeos com inserto foi feita por coloração da colônia de bactéria induzida por X-Gal (40 µg/µL) e IPTG (0,5 mM).

As colônias com o inserto foram transferidas com um palito de madeira autoclavado para nova placa com meio de cultura com ampicilina, X-gal e IPTG e, após crescimento, foram pinçadas com ponteiros estéreis, eluídas em água e aquecidas a 98°C para quebra da membrana e liberação do plasmídeo. Para confirmar a clonagem do fragmento de TE desejado, o DNA foi usado em PCR, conforme descrito no item 3.3, e analisado por eletroforese, conforme item 3.4. As reações que geraram fragmentos de tamanho compatível ao fragmento clonado foram purificadas por NucleoSAP (CELLCO) e enviadas para sequenciamento em duas orientações.

3.7 Sequenciamento

Para o sequenciamento do fragmento encontrado foi isolado 2,5 µl do produto de PCR purificado juntamente com os iniciadores utilizados (um iniciador para cada reação de sequenciamento). As amostras foram enviadas à terceiros (ACTGene) para serem sequenciadas.

4 Resultados

4.1 Análise BLASTN de sequências dos TEs

O resultado do BLASTN do genoma de *D. sukii* é apresentado na Tabela 2. A análise sugere a presença dos TEs *hobo*, *gypsy*, *412* e *BuT2* neste genoma, porém com sequências degeneradas para os três últimos. No caso de *hobo*, os nossos resultados mostraram um total de seis sequências com identidade para esta espécie. Em sua maioria, são sequências pequenas, exceto uma, relativamente grande, com 649 pares de bases, na região inicial da sequência do elemento canônico (1 a 649 nucleotídeos), que apresenta 100% de identidade para esta espécie. Não foram encontradas evidências da presença de *Galileo*, *Mar* e *P* nesta espécie.

Tabela 2 – Resultado de maior escore em BLASTN de sequências de TEs no genoma de *D. suzukii*. Sequências dos TEs *P*, *hobo*, *gypsy* e *412* usadas na análise são sequências completas, enquanto que as de *Galileo*, *But2* e *Mar* são referentes a diferentes clones.

TEs	Sequência usada no BlastN	Escore e valor e	Identidade e lacunas
P	<i>D. melanogaster</i>	Escore= 944 (1046)	Identidade= 24/26 (92%),
	GenBank: X06779.1	Valor e= 0	Lacunas= 0/26
Hobo	<i>D. melanogaster</i>	Escore= 1171 (1298)	Identidade= 649/649 (100%),
	GenBank: M69216	Valor e= 0	Lacunas= 0/649
Gypsy	<i>D. melanogaster</i>	Escore= 1539 (1706)	Identidade= 1860/2533
	GenBank: M12927	Valor e= 0	(73%), Lacunas= 105/2533
412	<i>D. melanogaster</i>	Escore= 2810 (3116)	Identidade= 2750/3536
	GenBank: X04132	Valor e= 0	(78%), Lacunas= 55/3536
Galileo	<i>D. buzzatii</i>	Escore= 44.6 (48)	Identidade= 30/34 (88%),
	GenBank: AY756168.1	Valor e= 0.016	Lacunas= 0/34
But2	<i>D. willistoni</i>	Escore= 50 (54)	Identidade 33/37 (89%),
	GenBank: BK006360.1	Valor e= 0.001	Lacunas= 0/37
Mar	<i>D. buzzatii</i>	Escore= 452 (500)	Identidade= 465/601 (77%),
	GenBank: AH010794.2	Valor e= 1e-124	Lacunas= 19/601
Mar	<i>D. willistoni</i>	Escore= 41 (44)	Identidade= 24/25 (96%),
	GenBank: AF518731.1	Valor e= 0,064	Lacunas= 0/25

A análise da sequência canônica de *hobo* mostrou que 22% das espécies com genoma disponível apresentaram uma ou mais sequências com identidade a sequência de *D. melanogaster*, enquanto que nos 77% restantes não foi detectado nenhuma sequência com identidade—entre eles estão *D. erecta*, *D. ficusphila*, *D. eugracilis*, *D. biarmipes*, *D. takahashii*, *D. elegans*, *D. rhopaloa*, *D. ananassae*, *D. bipectinata*, *D. pseudoobscura pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. miranda*, *D. willistoni*, *D. mojaveni*, *D. virilis*, *D. albomicans*, *D. grimshawi*.

Dentre as espécies que foram estudadas e que contem em seu genoma alguma sequência com identidade a sequência canônica do elemento *hobo* de *D. melanogaster* estão: *D. suzukii*, *D. yakuba*, *D. simulans*, *D. sechellia* e *D. kikkawai*.

Na Figura 1 é possível notar quais espécies contêm mais sequências com identidade a *D. melanogaster*.

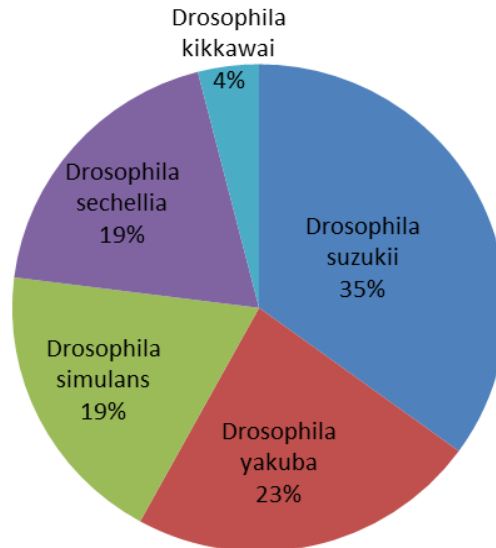


Figura 1 – Gráfico com a porcentagem referente ao número de sequências, com identidade ao TE *hobo*, encontradas em *D. kikkawai*, *D. suzukii*, *D. yakuba*, *D. simulans* e *D. sechellia*.

A Figura 2 nos possibilita visualizar o grau de similaridade existente entre as sequências das cinco espécies mencionadas, com relação à sequência canônica de *D. melanogaster*.

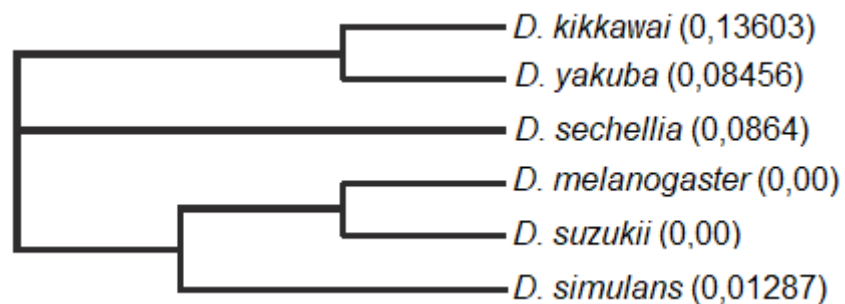


Figura 2 – Cladograma de similaridade entre as sequências do TE *hobo* de espécies do grupo *melanogaster* com identidade à sequência encontrada em *D. suzukii*. Os números indicam divergência entre as sequências em relação à sequência de *D. suzukii*.

4.2 Reações de PCR

Foram testados ao todo 12 pares de diferentes iniciadores durante as PCRs, utilizando o DNA genômico das espécies. Seguindo as condições de amplificação adotadas neste trabalho para alinhamento dos iniciadores, obteve-se resultado negativo para a grande maioria, com exceção de *GalR-F* e *Gal1-2* para o elemento *Galileo* em *D. suzukii* e *D. malerkotliana*. Os produtos amplificados com estes dois pares de iniciadores em ambas as espécies testadas estão apresentados na Figura 3. A análise indicou fragmentos de aproximadamente 800 e 3000pb para o par de iniciadores *GalR-F* e 400 e 630 pb para o par de iniciadores *Gal1-2* em *D. suzukii* e 1000pb para ambos, em *D. malerkotliana*.

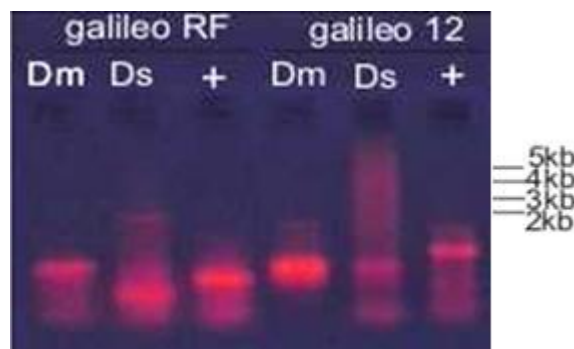


Figura 3 – Gel de agarose corado em Gel Red com os produtos de PCR usando os pares de iniciadores *GalR-F* e *Gal1-2* do TE *Galileo*. Dm: *D. malerkotliana*, Ds: *D. suzukii*, +: controle positivo *D. melanogaster* e marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder, identificado à direita.

Também foi registrada resposta positiva nas PCRs para o TE 412 em *D. suzukii*, porém os resultados mostraram bandas com fraca intensidade de sinal, sendo pouco visíveis.

4.3 Análise da sequência de *Galileo* de *D. suzukii*

Apenas um dos fragmentos amplificados de *Galileo* de *D. suzukii* foi isolado e sequenciado (Apêndice A). A Figura 4 nos permite ter uma ideia da identidade da sequência encontrada com sequências presentes em outras espécies de *Drosophilidae*.

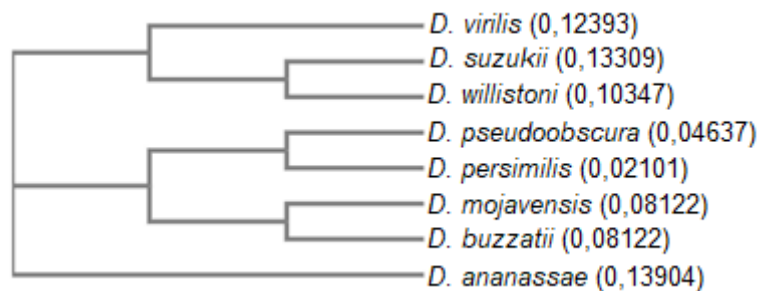


Figura 4 – Cladograma de similaridade com base na sequência de *Galileo* encontrada no genoma de *D. suzukii*. Valores significam o grau de similaridade das sequências encontradas com a sequência canônica do elemento.

5 Discussão

Devido à fraca intensidade do fragmento amplificado com os iniciadores de 412 em *D. malerkotliana* e *D. suzukii*, podemos presumir que este já tenha acumulado um número elevado de mutações, divergindo da sequência de *D. melanogaster*, e, por essa razão, a mesma não foi estudada neste momento.

Como a investigação dos TEs em *D. suzukii* teve duas abordagens, observamos discrepância nos resultados. O resultado positivo para *hobo* no BlastN do genoma de *D. suzukii* e negativo na PCR ocorreu porque os iniciadores usados não abrangem a região 5' do TE, a qual possui maior identidade, o que sugere que apenas uma parte do TE esteja conservada.

De acordo com Daniels et al (1990), dos TEs conhecidos para o gênero *Drosophila*, *hobo* é o que apresenta uma das distribuições mais restritas, sendo detectado, por exemplo, no grupo *melanogaster* (Subgênero *Sophophora*), em

espécies como *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. sechellia* (DANIELS et al, 1990; PERIQUET et al, 1990). Daniels et al (1990) sugere ainda que o elemento *hobo* teria dois momentos de invasão, sendo uma invasão antiga, no grupo *melanogaster*, que se espalhou mediante transmissão vertical; e um mais recente representado pelo *hobo* canônico presente no subgrupo *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. mauritiana*, *D. teissieri*, *D. yakuba*, *D. santomea*, *D. erecta*, *D. orena*). Neste contexto, a sequência de *hobo* canônico teria invadido o ancestral do subgrupo *Drosophila melanogaster* e subgrupo *Drosophila mimetica*, ao qual pertence *D. suzukii*, e teria então sido transmitido às espécies descendentes via transferência vertical, bem como teria passado pela degeneração da sequência. O estudo de outras espécies do subgrupo *Drosophila mimetica* poderia corroborar com esta proposição. A outra possibilidade é a TH do elemento proveniente de *D. simulans* para *D. suzukii*, seguido de uma rápida degradação da região 3', cuja possibilidade é muito baixa; ou a TH da região de 1 a 649 nt da sequência de *hobo*.

No caso de *Galileo*, que foi positivo na PCR e negativo na investigação por BlastN, algumas possibilidades devem ser consideradas: o genoma da espécie não está completamente disponível; há linhagens com e sem a sequência do TE, sendo que a linhagem usada na PCR possuiria o TE; e, por fim, a necessidade de confirmar, por sequenciamento, a identidade de um maior número de fragmentos amplificados. Cáceres; Puig; Ruiz (2001) ressaltam a capacidade desse elemento para formar estruturas secundárias quando desnaturado, o que pode ser exemplificado pelas dificuldades encontradas durante sua amplificação por PCR.

De acordo com o resultado do sequenciamento de um dos fragmentos da PCR, observamos baixa identidade a *Galileo* em *D. suzukii*, sugerindo que o elemento está degenerando no genoma desta espécie. O resultado está de acordo com o estudo de outras espécies, que identificaram sequências não ativas e que estas estão amplamente difundidas em espécies do gênero *Drosophila* (MARZO et al, 2008; MARZO et al, 2013).

Uma busca experimental por sequências de *Galileo* em outras espécies de *Drosophila* sugeriu que este TE tem uma distribuição bastante restrita, estando presente apenas nos parentes mais próximos de *D. buzzatii* (CASALS et al, 2005).

Quanto a presença de *Galileo* em *D. malerkotliana*, está é a primeira evidência deste TE no genoma da espécie. De acordo com Casals (2003), *Galileo* foi descoberto em *Drosophila buzzatii* e é o único TE no gênero *Drosophila* que demonstrou ter gerado inversões cromossômicas na natureza. Estas, por sua vez, são necessárias para alguns rearranjos cromossômicos, os quais podem ou não ser adaptativos aos diferentes ambientes (GONÇALVES, 2010).

A identidade da sequência de *Galileo* encontrada em *D. suzukii* com as demais espécies comparadas (Figura 4) chama a atenção, pois a sequência se mostrou muito similar às sequências de *D. willistoni* e *D. virilis*, espécies que filogeneticamente estão distantes de *D. suzukii*, como é mostrado na Figura 5. Marzo et al (2008) comenta que o TE *Galileo* de *D. willistoni* e *D. virilis*, embora pertencentes a diferentes subgêneros (*Sophophora* e *Drosophila*, respectivamente), são parentes próximos um do outro, assim como este mesmo elemento em *D. mojavensis* e *D. buzzatii* (subgênero *Drosophila*) está mais relacionado ao de *D. ananassae*, *D. pseudoobscura* e *D. persimilis* (subgênero *Sophophora*) do que o de *D. virilis*, uma espécie do mesmo subgênero.

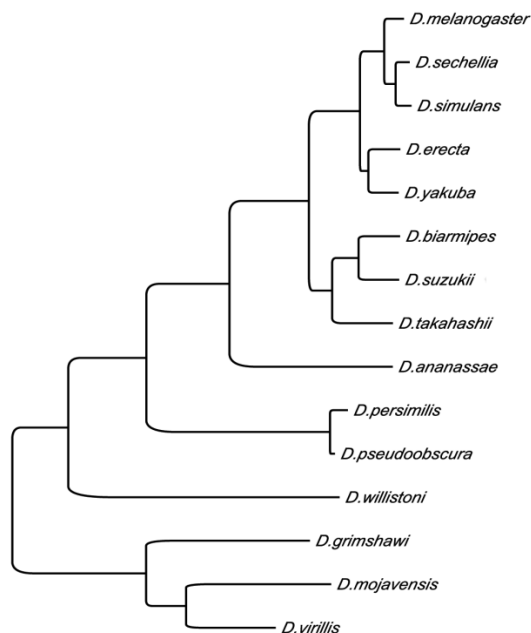


Figura 5 – Árvore de máxima verossimilhança com melhor pontuação de 15 espécies de *Drosophila* + grupo externo de *A. gambiae* (não mostrado) usando 5.322 partições gênicas com 5.199.249 locais. O modelo é JTTF + Γ . Fonte: < <http://spottedwingflybase.org/>>. Acesso em 19 de out. de 2018.

Como dito anteriormente, Page (1998) reforça que há duas explicações possíveis para essas disparidades: triagem de linhagem e transferência horizontal. A primeira refere-se à diversificação vertical das linhagens dos TEs e sua perda diferencial ao longo dos ramos da árvore de espécies. Já a transferência horizontal é o processo de invasão de um novo genoma por um TE, que é comum para os transposons e é considerado como uma fase integral do ciclo do seu ciclo de vida, permitindo a sobrevivência do elemento em longo prazo (HARTL, 1997; SILVA, 2004). No entanto, a evidência disponível para TH de *Galileo* não é convincente, pois, em primeiro lugar, *D. suzukii* e *D. willistoni* não compartilham o mesmo nicho, uma vez que consomem recursos diferentes do ambiente, o que torna pouco provável que exista interação entre essas duas espécies. Em segundo lugar, no caso de termos um evento de TH, a recente invasão de *D. suzukii* no Brasil deveria acarretar em uma sequência com 100% de identidade a *Galileo* em seu genoma, porém, não foi o que vimos. Tudo indica que a sequência encontrada deriva de um ancestral comum de *D. suzukii* e *D. willistoni*, que por alguma razão manteve sua identidade, e a triagem de linhagem deve ser considerada, neste momento, como uma explicação igualmente provável.

6 Considerações Finais

Com este trabalho foi possível identificar a existência do elemento *hobo* e do elemento *Galileo* no genoma de *Drosophila suzukii* e do elemento *Galileo* em *D. malerkotliana*. O presente estudo, além de elencar elementos para a investigação nas espécies em questão, contribui com a informação da distribuição de TEs no grupo *melanogaster*, contribuindo com o entendimento da transferência horizontal e das perdas estocásticas dos elementos ao longo da evolução das espécies.

A continuidade de trabalhos com estes dois elementos nestas espécies é extremamente relevante para uma melhor compreensão da evolução dos TEs e da indicação de TH.

Referências

BELAN, E. LINEs of evidence: Noncanonical DNA replication as an epigenetic determinant. **Biology Direct** – EUA, v. 8, n. 22, 2013.

BITNER-MATHÉ, B. C.; VICTORINO, J.; FARIA, F. S. *Drosophila suzukii* has been found in tropical Atlantic Rainforest in southeastern Brazil. **Drosoph Inf Serv** – EUA, n. 97, p. 136-137, 2014.

BIRDSLEY, J. S. *Drosophila malerkotliana* and *D. ananassae* in Florida. **Drosophila Inf Serv** – EUA, v. 86, p. 112, 2003.

BLAUTH, M. L.; BRUNO, R. V.; ABDELHAY, E.; VALENTE, V. L. S. Spatiotemporal transcription of the P element and the 412 retrotransposon during embryogenesis of *Drosophila melanogaster* and *D. willistoni*. **Genetics and Molecular Biology** – EUA, v. 34, n. 4, p. 707-710, 2011.

CÁCERES, M.; PUIG, M.; RUIZ, A. Molecular characterization of two natural hotspots in the *Drosophila* genome induced by transposon insertions. **Genome Res.** – EUA, v. 11, p. 1353-1364, 2001.

CALABRIA, G.; MACA, J.; BACHLI, G.; SERRA, L.; PASCUAL, M. First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. **Journal of Applied Entomology** – EUA, v. 136, p. 139-147, 2012.

CAPY, P.; ANXOLABEHÈRE, D.; LANGIN, T. The strange phylogenies of transposable elements: are horizontal transfers the only explanation? **Trends Genet** – EUA, v. 10, n. 1, p. 7-12, 1994.

CARARETO, C. M. A. **Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos.** In: PEARCE, VITORELLO, Claudia Barros Monteiro.; ANNE VAN SLUZS, Marie. (Org.). Sociedade Brasileira de Genética. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015.

CASALS, F.; CACERES, M.; MANFRIN, M. H.; GONZALEZ, J.; RUIZ, A. Molecular characterization and chromosomal distribution of *Galileo*, *Kepler* and *Newton*, three foldback transposable elements of the *Drosophila buzzatii* species complex. **Genetics** – EUA, v. 169, p. 2047–2059, 2005.

CASALS, F.; CACERES, M.; RUIZ, A. The foldback-like transposon *Galileo* is involved in the generation of two different natural chromosomal inversions of *Drosophila buzzatii*. **Mol Biol Evol** – EUA, v. 20, p. 674–685, 2003.

CHENAIS, B.; CARUSO, A.; HIARD, S.; CASSE, N. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes. **Gene** – EUA, v. 509, n. 1, p. 7-15, 2012.

CHIU, J. C.; JIANG, X.; ZHAO, L.; HAMM, C. A.; CRIDLAND, J. M.; SAELAO, P.; HAMBY, K. A.; LEE, E. K.; KWOK, R. S.; ZHANG, G.; ZALOM, F. G.; WALTON, V. M.; BEGUN, D. J. Genome of *Drosophila suzukii*, the spotted wing drosophila. **G3: Genes, Genomes, Genetics** – EUA, v. 3, p. 2257–2271, 2013.

CINI, A.; IORIATTI, C.; ANFORA, G. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. **Bulletin of Insectology**, v. 65, n. 1, p. 149-160, 2012.

CIZERON, G.; LEMEUNIER, F.; LOEVENBRUCK, C.; BREHM, A.; BIÉMONT, C. Distribution of the retrotransposable element 412 in *Drosophila* species. **Mol Biol Evol** – EUA, v. 15, p. 1589-1599, 1998.

COATES, B. **Spotted wing drosophila: host observations**. In: SPOTTED WING DROSOPHILA MEETING, 2., Nov. 2009, DAVIS, C. A.: UC IPM, 2009. Disponível em: <<http://www.ipm.ucdavis.edu/IPMPROJECT/SWD/Spotted-Wing-Drosophila-Host-Observations.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

CONTE, C.; DASTUGUE, B.; VAURY, C. Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. **EMBO J**, v. 21, n. 14, p. 3908-3916, 2002.

CRAIG, N.; CRAIGIE, R.; GELLERT, M.; LAMBOWITZ, A. **Mobile DNA II**. ASM Press – Washington, DC, 2002.

DANIELS, S.B.; CHOVNICK, A.; BOUSSY, I. A. Distribution of *hobo* transposable elements in the genus *Drosophila*. **Biol. Evol.** – EUA, v. 7, p. 589-606, 1990.

DEPRÁ, M.; LUDWIG, A.; VALENTE, V. L. S.; LORETO, E. L. S. *Mar*, uma família MITE de *hAT* transposons em *Drosophila*. **DNA Mob**, v. 3, p. 3-13, 2012.

DEPRÁ, M.; POPPE, J. L.; SCHMITZ, H. J.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. **Journal of Pest Science** – EUA, v. 87, p. 379–383, 2014.

DE SETTA, N.; CARARETO, C. M. A. Screening for transposable elements in South America invasive species *Zaprionus indianus* and *Drosophila malerkotliana*. **Drosophila Information Service** – EUA, v. 90, p. 96-99, 2007.

DOS SANTOS, L. A.; MENDES, M. F.; KRÜGER, A. P.; BLAUTH, M. L.; GOTTSCHALK, M. S.; GARCIA, F. R. M. Global potential distribution of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). **PLoS ONE**, v. 3, p.12: e0174318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174318>, 2017.

FAULKNER, G. J. Retrotransposons: Mobile and mutagenic from conception to death. **FEBS Lett** – EUA, v. 585, n. 11, p. 1589-1594, 2011.

FESCHOTTE, C. The contribution of transposable elements to the evolution of regulatory networks. **Nat. Rev. Genet.** – EUA, v. 9, p. 397-405, 2008.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J.. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annu Rev.** – EUA, v. 41, p. 68-331, 2007.

GARCIA, A. C.; GOTTSCHALK, M. S.; AUDINO, G. F.; ROHDE, C.; VALIATI, V. H.; VALENTE, V. L. S. First evidence of *Drosophila malerkotliana* in the extreme south of Brazil (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil). **Drosophila Information Service** – EUA, v. 88, p. 28-30, 2005.

GONZÁLEZ, J.; PETROV, D. A. The Adaptive Role of Transposable Elements in the *Drosophila* Genome. **Gene** – EUA, v. 448, n. 2, p. 124-133, 2009.

GONÇALVES, J. W.; VALIAT, V. H.; DELPRAT, A.; VALENTE, V. L. S.; RUIZ, A. Structural and sequence diversity of the transposon *Galileo* in the *Drosophila willistoni* genome. **BMC Genomics** – EUA, v. 15, n. 792, 2014.

GOODHUE, R. E.; BOLDA, M.; FARNSWORTH, D.; WILLIAMS, J. C.; ZALOM, F. G. Spotted wing *Drosophila* infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. **Pest Management Science** - Oxford, v. 67, n. 11, p. 1396-1402, 2011.

GOODIER, J. L.; KAZAZIAN, H. H. Jr. Retrotransposons revisitado: a contenção e recuperação de parasitas. **Cell** – EUA, v. 135, n. 1, p. 23-35, 2008.

HARING, E.; HAGEMANN, S.; PINSKER, W. Different evolutionary behavior of P element subfamilies: M-type and O-type in *Drosophila bifasciata* and *D. imaii*. **Gene** – EUA, v. 163, p. 197-202, 1995.

HARTL, D. L.; LOHE, A. R.; LOZOVSKAYA, E. R. Modern thoughts on an ancient mariner: Function, evolution, regulation. **Annu Rev Genet** – EUA, v. 31, p. 337–358, 1997.

HARTL, D. L.; LOZOVSKAYA, E. R. What restricts the activity of mariner - like transposable elements? **Trends Genet** – EUA, v. 13, p. 197-201, 1997.

HAUSER, H. Uma conta histórica da invasão de *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) no território continental dos Estados Unidos, com observações sobre a sua identificação. **Pest Manag. Sci.** – EUA, v. 67, n. 11, p. 7-1352, 2011.

HERÉDIA, F.; LORETO, E. L. S.; VALENTE, V. L. S. Complex Evolution of cigana em drosofilídeos. **Mol. Biol. Evol.** – EUA, v. 21, p. 1-12, 2004.

HOUCK, M. A.; CLARK, J. B.; PETERSON, K. R.; KIDWELL, M. G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. **Science** – EUA, v. 253, n. 5024, p. 1125-1128, 1991.

HUEY, R. B.; GILGHRIT, G. W.; HENDRY, A. P. Using invasive species to study evolution. Case studies with *Drosophila* and salmon. In: SAX, D. F.; STACHOWICZ, J. J.; GAINES, S. D. Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography. **Sunderland: Sinauer Associates Inc.** – EUA, p: 139-164, 2005.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY, O.; JURKA, M. V. Repetitive sequences in complex genomes: Structure and evolution. **Annu Rev Genomics Hum Genet** – EUA, v. 8, p. 59-241, 2007.

KAER, K.; SPEEK, M. Retroelements in human disease. **Gene** – EUA, v. 518, n.2, p. 231-241, 2013.

KANESHIRO, K. Y. Speciation in the Hawaiian "*Drosophila*": Sexual Selection Appears to Play an Important Role. **Bio. Science** – EUA, v. 38, n. 4, p. 258-263, 1988.

KIDWELL, M. G. Horizontal transfer of P elements and other repeated transposons reversed short. **Genetic** – EUA, v. 86, n. 1-3, p. 86-275, 1992.

KLEIN, C. C. **Estudo de fenômenos possivelmente relacionados com a mobilização de elementos transponíveis e à presença de endoparasitas em populações de *Drosophila willistoni***. M. Sc. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2002.

KONING, A. P.; GU, W.; CASTOE, T. A.; BATZER, M. A.; POLLOCK, D. D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. **PLoS Genet** – EUA, v. 7, n. 12, 2011.

LANDER, E. S. et. al. Internacional Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Bioinformatics** – EUA, v. 17, n. 12, p. 6822, p. 860-921, 2001.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEE, J. C.; BRUCK, D. J.; CURRY, H.; EDWARDS, D.; HAVILAND, D. R.; VANSTEENWYCK, R. A.; YOUNGEY, B. M. The susceptibility of small fruit and cherries to the spotted wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. **Pest Manag Sci**, EUA, v. 67, p.1358-1367, 2011.

LOHE, A. R. MORIYAMA, E. N.; LIDHOLM, D. A.; HARTL, D. L. Horizontal transmission, vertical inactivation and stochastic loss of mariner-like transposable elements. **Mol. Biol. Evol.** – EUA, v. 12, p. 62-72, 1995.

LORETO, E. L.; CARARETO, C. M.; CAPY, P. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Heredity (Edinb)** – EUA, v. 100, n. 6, p. 545-54, 2008.

MARSANO, R. M.; CAIZZI, R.; MOSCHETTI, R.; JUNAKOVIC, N. Evidence for a functional interaction between the *Bari1* transposable element and the cytochrome P450 *cyp12a4* gene in *Drosophila melanogaster*. **Gene** – EUA, v. 357, p. 8-122, 2005.

MARZO, M.; BELLO, X.; PUIG, M.; MASIDE, X.; RUIZ, A. Striking structural dynamism and nucleotide sequence variation of the transposon *Galileo* in the genome of *Drosophila mojavensis*. **Mobile DNA** – EUA, v.4, n. 6, 2013.

MARZO, H.; PUIG, H.; RUIZ, A. The Foldback element similar to *Galileo* belongs to the superfamily of DNA transposons *P* and is widespread in the *Drosophila* genus. **PNAS** – USA, v. 105, p. 2957-2962, 2008.

MIOUSSE, I. R.; CHALBOT, M. C.; LUMEN, A.; FERGUSON, A.; KAVOURAS, I. G.; KOTURBASH, I. Resposta de elementos transponíveis para agressões ambientais. **Mutat Res Rev mutat** – EUA, v. 765, p. 19-39, 2015.

MONTCHAMP-MOREAU, C.; RONSSERAY, S.; JACQUES, M.; LEHMANN, M.; ANXOLABEHÈRE, D. Distribution and conservation of sequences homologous to the 1731 retrotransposon in *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** – EUA, v. 10, n. 4, p. 791-803, 1993.

O'HARE, K & RUBIN, G. M. Structure of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. **Cell** – EUA, v. 34, p. 25-35, 1983.

ORTIZ, M. F.; WALLAU, G. L.; GRAICHEN, D. A.; LORETO, E. L. Uma avaliação da relação ecológica entre as espécies *Drosophila* e suas vespas parasitóides como uma oportunidade para a transferência de *transposon* horizontal. **Mol Genet Genomics** – EUA, v. 290, n. 1, p. 67-78, 2015.

OSTERTAG, E. M.; KAZAZIAN, H. H. Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. **Annu Rev Genet** – EUA, v. 35, p. 501-38, 2001.

PAGE, R. D.; CHARLESTON, M. A. Trees within trees: Phylogeny and historical associations. **Trends Ecol Evol** – EUA, v. 13, p. 356–359, 1998.

PAULA, M. A.; LOPES, P. H. S.; TIDON, R. First record of *Drosophila suzukii* in the Brazilian Savanna. **Drosoph Inf Serv** – EUA, v. 97, p. 113–115, 2014.

PERIQUET, G.; HAMELIN, M. H.; KALMES, R.; EEKEN, J. *hobo* elements and their deletion-derivative sequences in *Drosophila melanogaster* and its sibling species *D. simulans*, *D. mauritiana* and *D. sechellia*. **Genet. Select. Evol.** – EUA, v. 22, p. 393-402, 1990.

RANKIN, D. J.; ROCHA, E. P. C.; BROWN, S. P. What traits are carried on mobile genetic elements, and why? **Heredity (Edinb)** – EUA, v. 106, n. 1, p. 1-10, 2011.

REBOLLO, R.; ROMANISH, M. T.; MAGER, D. L. Elementos transponíveis: uma fonte abundante e natural de sequências regulatórias para genes do hospedeiro. **Annu Rev Genet** – EUA, v. 46, p. 21-42, 2012.

ROSSATO, D. O.; LUDWIG, A.; DEPRÁ, M.; LORETO, E. L. S.; RUIZ, A.; VALENTE, V. L. S. *BuT2* is a member of the third major group of *hAT* transposons and is involved in horizontal transfer events in the genus *Drosophila*. **Genome Biol. Evol.** – EUA, v. 6, n. 2, p. 352-365, 2014.

ROTA-STABELLI, O.; BLAXTER, M.; ANFORA, G. *Drosophila suzukii*. **Science Direct** – EUA, v. 23, n. 1, p. 8-9, 2013.

RUFO, V. C. **Disgenesia híbrida induzida pelos elementos transponíveis *P* e *hobo* em linhagens de *Drosophila melanogaster* de diferentes regiões brasileiras.** 1997. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado de São Paulo, São José do Rio Preto, 1997.

SANCHEZ-GRACIA, A.; MASIDE, X.; CHARLESWORTH, B. High rate of horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. **Trends Genet** – EUA, v. 21, p. 200-203, 2005.

SCHLÄPPI, M.; RAINA, R.; FEDOROFF, N. Epigenetic regulation of the maize *Stm* transposable element: novel activation of a methylated promoter by *TnpA*. **Cell** – EUA, v. 77, p. 427-437, 1994.

SILVA, J. C.; LORETO, E. L.; CLARK, J. B. Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. **Curr Issues Mol Biol** – EUA, v. 6, p. 57–71, 2004.

TORRES, F. P. **O elemento transponível *hobo* e suas sequências relacionadas no genoma de *Drosophila simulans*.** 2005. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2005.

VAL, F.C.; SENE, F. M. A newly introduced *Drosophila* species in Brazil (Diptera, Drosophilidae). **Pap. Avulsos Zool** – EUA, v. 33, p. 19, 1980.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, A. H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nat Rev Genet** – EUA, v. 8, p. 673-928, 2007.

Apêndices

Apêndice A – Sequência encontrada para *Galileo* em *D. suzukii*

Sequência do TE *Galileo* encontrada no genoma de *D. suzukii*, alinhada com múltiplas sequências de espécies do gênero *Drosophila* com auxílio do algoritmo *CLUSTAL* e do software *MUSCLE* (3.8).

```

virilis      GGTACAGTGTTCATGGCAAATATTAG-----TTAAAAATATTTTCAGATTGACACTGACAAC
suzukii     GGTACAGTCTCCTGGCATGTAGTGG-----TGAGATTGCTTGAAAATGATACAAGCAAC
willistoni  GGTAGAGTCTCTTGGCAAGTAATTG-----TCAAATGTTTTGAAAATAGACACAAAAAAC
pseudoobscura  GGCGTTGTTTTTCATAGAAAACAGTCGAAGAACGAAGAACATATGAAAATCGATTCCAGAAA-
persimilis  GGCGTTGTTTTTCATGGAAAATAGTCGAAGAACGAAGAACGTATGAAAATCGATTCCAGAAA-
ananassae   GGAGAAGTATCTTGGGATATAATTA-----AGAAAATATACCAAAATGAGTCTAGAAA-
mojavensis  GGTACAGTTTTTCATGGGAATAATTA-----GAAAATATATGAAACTGAAACCAAGAA-
buzzatii    GGCACAGTTTTCGTGAATATAATTA-----GAAAATATATACGAAAATAGAATCTAAAAA-
**      ** * * * *      * *      * *      * * * * * * * *

virilis      AGTTCTACTCGATTATGTCCAAAGCTTTCTAGGAAACATATGTATATACCCCAACTCTTT
suzukii     ACTTCTATAAGAATGTGCCCAAATTAACAAGGAAACACATATTT----CCGAAATATTT
willistoni  ACTTCCGCAAGAATGTGCCCAAATTTATCCCGAAAACACATATAT----CCCAACTCATT
pseudoobscura  --TTCAACGCGACTCTGCCCGAAAATTAACAACAAGCATATAAAT----CCAAATAGCTT
persimilis  --TTCAACGCGACTCTGCCCGAAAATTAACAACAAGCATATAATAT----CCAAATAGCTT
ananassae   --CTCAACGCGCTTTGTCCCAAAGTAACGGCGAAGCATATAAAT----CCAAACTCATT
mojavensis  --TTTAAACACGTTTATGTCCGAAAATTAACCTTAAAGCATGTGAGT----CCGAATTGCTT
buzzatii    --CTTGACACGTTTATGTCCAAAATGACTTCAAAAACATGTGAGT----CCAAATTGTTT
      *      * * * * * * * *      * * * * * * * * * *

virilis      CGAAAAAATGAAAAGTTAAATATGCTACTCAAATTTTTAGTCATACAGTTGCTTCTGCCAT
suzukii     GGAGTCAAGGAGAGGGTAATATGCAACGCAGGTATTTAGCCAAACAGTATCATCCGCAT
willistoni  TGAGAAGATGAAGGTGAAATATGCAACACAGGTATTTAGCCAAACAGTTGCTTCTGCACT
pseudoobscura  TGAAAAAATGAAGGTCAAATATGCCACTCAAGTGTTTTAGCCATAGTGTGGCCGCTGCCT
persimilis  TGAAAAAATGAAGGTCAAATATGCCACTCAAGTGTTTTAGCCATAGTGTGGCCGCTGCCT
ananassae   TGAAAAAATGAAGTTAAGTATGTACTACACAAATATTTAGCCACACTGTTGGCGCCGCAAT
mojavensis  TGAAAAAATGAAAAGTGAATTAGCAACACAAATCTTTAGCCACAGTGTAGCTGCTGCCAT
buzzatii    TGAGAAGATGAAGTCAAATATGCAACCCAGGTTTTTAGCCACAGTGTAGCTGCTGCCAT
      **      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

virilis      CAAAACATTAATTCAAATGGCAATTTTCGCTGATTGCCGAGAAGTTGCACTCTCGACGGC
suzukii     TAAAACATTGATCCAACATGGCAAATTTATTGACTGCGAAGATGTGGCAATCGCAACATC
willistoni  CAAGACGCTAATACAAAACGGCACTTTTCATGACTGCGAAGATGTGGCAATCGCGACATG
pseudoobscura  TCGAACAATTATTAGTTCTGGAGGCTTCTTAAAGTGCAAAGAAAATGCAAGAAGTGCAAG
persimilis  TCGAAAAAATTTAGTTCTGGAGGCTTCTTAAAGTGCAAAGAAAATGCAAGAAGCGACGGC
ananassae   CCGAACAGTGGTTGATTCTGGTGGATTTGTGGATTGCCGAAATAGCGCAGAAGCTACGGC
mojavensis  ACGCACTGTTGTCGAAACAGGTGGGTTTGGCGATTGCAAAGACAGTGCAGTTGCAACGGC
buzzatii    ACGCACTGTTATTGATTCGGTGGGTTTTCTGATTGTAAGGATAGTGCAGTTGCAACGGC
      *      * * *      **      **      * * * * * * * * * *

virilis      CAAATTTATTGAAAAGGTTAATAAGCTTTTTGATTGTTTAAATAGCAAT
suzukii     TAAATTTATAGAAAAGTTAATAGGTTGTTTCGATTGCTTGAATAGCAGT
willistoni  TAAGTTTATTGAGAAGATTAATAAGCTGTTTGTATTGTTTAAATAGCAAC
pseudoobscura  AAAATTTATTGAAAAAATGAATCGATTATACGACTGTCTAAATAATCAT
persimilis  TACATTTATTGAAAAAATTAATCGATTATTTCGACTGTCTAAATAATCAT
ananassae   TAATTTTATAGAAAAGGTTAATAAAGCTTTTATTGATTGCTTAAATAGCCAC
mojavensis  AATATTTATAGATAAAAATTAATAACCTTTTTGATTGCTTAAATAGTCAT
buzzatii    AATATTTATTGAAAAAATAAATAGACTTTTTGATTGTTTAAATAGCCAT
      *      * * * * * * * * * * * * * * * *

```